论著

文章编号:1000-5404(2013)24-2648-06

NMDA 经 p38MAPK 信号通路诱导体外培养的皮层神经元损伤

季恩飞,刘学文,田步先,郭金刚 (121000 辽宁 锦州,辽宁医学院附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 观察 MK801 及 SB203580 对 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)诱导的皮层神经元损伤的影响,探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路在神经元损伤中的作用和机制。**方法** 培养 7 d 的新生 SD 大鼠皮层神经元,分为 5 组:对照组、NMDA 损伤组、MK801 干预组、SB203580 干预组、联合干预组(SB203580 + MK801)。噻唑蓝(MTT)比色实验评价细胞生存力,乳酸脱氢酶(LDH)释放率测定细胞损伤程度,吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 双重荧光染色观察细胞凋亡形态和数目,免疫细胞化学染色法和 Western blot 法检测大鼠皮层神经元各组p-p38MAPK、Bcl-2 和 BAX 表达情况。**结果** 同对照组比较,NMDA 损伤组神经细胞存活力显著降低,培养上清液中 LDH 含量明显增加,凋亡细胞增多,p-p38MAPK、BAX 表达增加,Bcl-2 表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);同 NMDA 损伤组比较,各个干预组细胞生存力提高,LDH 释放率降低,凋亡减少,p-p38MAPK 及 BAX 的表达减少,Bcl-2 表达增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** MK801、SB203580 对 NMDA 诱导的皮质神经元损伤具有保护作用,p38MAPK 通路可能参与介导 MK801 的保护作用,其共同机制部分是通过抑制 p38MAPK 信号通路介导的凋亡相关蛋白实现的。

[关键词] p38 丝裂原活化蛋白激酶;N-甲基-D-天冬氨酸;N-甲基-D-天冬氨酸受体;神经元损伤

[中图法分类号] R322.81;R329.26;R977.4 [文献标志码] A

NMDA induces cortical neuron injury *in vitro via* p38MAPK signaling pathway

Ji Enfei, Liu Xuewen, Tian Buxian, Guo Jingang (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning Province, 121000, China)

[**Abstract**] Objective To observe the effects of MK801 and SB203580 on N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-induced cerebral cortical neuron injury and to determine the role and possible action mechanism of p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK) signaling pathway in neuron injury. Methods Newborn SD rat cortical neurons were cultured for 7 d, and then randomly assigned to 5 groups: a control group, an NMDA injury group, an MK801 interventional group, an SB203580 interventional group, and a combined interventional group (SB203580 + MK801). MTT assay and lactate dehydrogenase (LDH) release assay were employed to assess primary neuron viability and cell membrane damage, respectively. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double fluorescent staining was used to observe morphology and cell apoptosis. Expression of p-p38MAPK, Bcl-2 and BAX was observed separately by IHC and Western blotting. Results Compared to the control group, markedly decreased cell viability, significantly increased LDH leakage and apoptotic cell number, increased expression of p-p38MAPK and BAX, and decreased expression of Bcl-2 were observed in the NMDA injury group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared to the NMDA injury group, MK801 and/or SB203580 improved cell viability, reduced LDH release rate and apoptosis, decreased the expression of p-p38MAPK and BAX, and increased the expression of Bcl-2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the interventional groups. Conclusion MK801 and SB203580 have protective effects on neurons with NMDA-induced injury. MK801 may protect the neurons from NMDA-induced injury through p38MAPK signaling pathway. The common mechanism involves partial inhibition of p38MAPK signaling pathway-mediated apoptosis-related proteins.

[**Key words**] p38 mitogen-activated protein kinases; N-methyl-D-aspartic acid; N-methyl-D-aspartate receptors; neuronal injury

Supported by the Tackling Project of Social Development of Department of Science and Technology of Liaoning Province (2012225019) and the Coorperation Project of First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College of Jinzhou Aohong Pharmaceutical co., Ltd(20110033). Corresponding author: Liu Xuewen, E-mail: sjnklxw@163.com

[基金项目] 辽宁省科技厅社会发展攻关计划(2012225019);辽宁医学院附属第一医院和锦州奥鸿药业有限责任公司合作课题(20110033)

[通信作者] 刘学文,E-mail: sjnklxw@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131012.1813.005.html(2013-10-12)

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)是介导神经元存活和死亡的重要通络,参与细胞生长、分化、发育和凋亡等多种病理过程[1]。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)是MAPK家族中的一种可被各种细胞外应激信号激活的信号通路,是介导神经元生存和死亡的重要通路[2]。N-甲基D-天(门)冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid,NMDA)是一种兴奋性氨基酸,它的过度释放可以引起NMDA受体(NMDAR)的激活,进而介导钙离子大量内流,导致钙离子超载,产生细胞毒性[3]。大量研究证明[2,4],NMDAR的过度激活在神经系统发育和多种神经退行性疾病的发展过程中扮演着重要的作用。研究还发现,NMDA受体激活引起钙离子超载后可激活p38MAPK途径,进而介导毒性作用,由此导致皮质神经细胞死亡[5]。然而,NMDA诱导神经元损伤后,对p38MAPK信号通路起抑制作用的药物研究仍是现在研究的热点,其保护作用的机制仍是复杂的。本实验选择NMDAR特异性激动剂NMDA制造体外培养细胞的损伤模型,将从信号转导通路和凋亡因子相结合的两方面探讨NMDAR抑制剂MK801和p38MAPK抑制剂SB203580对体外培养神经元毒性损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基、胎牛血清、马血清、胰蛋白酶均购自HyClone公司,兔抗鼠神经元特异性稀醇化酶(neurone specific enolase,NSE)多克隆抗体、兔抗p-p38MAPK多克隆抗体、兔抗Bcl-2、BAX多克隆抗体均购自Santa Cruz公司,羊抗兔IgG-FITC(武汉博士德生物工程有限公司),S-P免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),乳酸脱氢酶试剂盒(南京建成生物工程研究所)。MTT、多聚赖氨酸、阿糖胞苷、NMDA、NMDA受体抑制剂MK801、p38MAPK抑制剂SB203580均购自Sigma公司。

二氧化碳培养箱(YAMATO IT-61,日本),倒置相差显微镜、荧光显微镜(Nikon,日本),酶联免疫检测仪(上海嘉鹏科技公司),细胞图像分析(北京大恒图像视觉有限公司),高速冷冻离心机(美国DUPONT/SORVALL)。

1.2 原代大鼠皮层神经元培养

参照文献[4]记载方法略加改动,取生后24~48 h SD大鼠(辽宁医学院实验动物中心提供),分离大鼠皮层组织,将组织悬液离心,胰酶消化,震荡,终止消化后离心去上清,加入适当的10%胎牛血清和10%马血清的DMEM/F12,吹打数次,过滤,将细胞种植在培养板中,置37 ℃,5% CO_2的培养箱内培养,第2~3天加入阿糖胞苷抑制非神经元增殖,以后每3天换液1次,每次换半量。倒置相差显微镜定期观察细胞的生长情况。

1.3 神经元鉴定

免疫荧光染色鉴定神经元的纯度。将培养在载玻片上的细胞用PBS冲洗→多聚甲醛固定→PBS冲洗→牛血清清蛋白封闭→加一抗NSE抗体(1∶200) 4 ℃冰箱孵育过夜→复温,PBS冲洗→加二抗(FITC标记羊抗兔IgG,1∶100)室温避光孵育→PBS冲洗→封片,荧光显微镜下观察。

1.4 实验处理及分组

细胞接种于96孔培养板,分5组,每组6孔。①对照组,仅用DMEM/F12培养基。②NMDA损伤组(50 μmol/L)。③MK801干预组(10 μmol/L)。④SB203580干预组(10 μmol/L)。⑤联合干预组(MK801和SB203580各10 μmol/L)。后3组在药物预处理30 min,分别加50 μmol/L NMDA孵育24 h,进行后续实验。

1.5 细胞生存力测定

采用MTT法进行。96孔板内各组细胞在药物处理相应的时间点后,每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μL(终浓度为0.5 g/L),于37 ℃孵箱孵育4 h,弃上清,每孔加入200 μL DMSO,振荡20 min,置酶标仪570 nm处测定光密度值[D(570)]。

1.6 乳酸脱氢酶(lactic acid dehydrogenase,LDH)漏出率

①上清液样品制备:吸取24孔板上清液,4 ℃,3 000 r/min,离心10 min,分装上清液。②细胞样品制备:将24孔板分组,每组4个复孔,吸取上清液后,预热的PBS洗2次,每孔加入500 μL Triton X-100(PBS配为1%),37 ℃孵育30 min,待细胞完全破碎,吸取液体,4 ℃,3 000 r/min,离心10 min,分装上清液,按试剂盒说明书进行LDH活性的测定。LDH漏出率=上清D(570)/[上清D(570)+细胞D(570)]×100%。

1.7 吖啶橙/溴化乙锭(acridine orange/ethidium bromide, AO/EB)双重荧光染色

AO/EB染料:精确称取AO、EB各100 mg,分别溶于10 mL pH 7.2 PBS中使之配成10 mg/mL的储备液,用前等量混合,备用。培养好的24孔板的细胞每6孔分为1组,药物干预后培养24 h后,全量换液。每孔按每1 mL培养液加1 μL 1∶1混合的储备液。然后置于荧光显微镜下直接观察。每孔细胞随机选3个不重合的视野拍片并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率按以下公式计算:细胞凋亡率=(早期凋亡细胞+晚期凋亡细胞)/总细胞数×100%。

1.8 免疫细胞化学染色法检测p38MAPK、Bcl-2、BAX蛋白的表达

24孔培养板内制作细胞爬片→贴壁生长第7天加入处理因素,24 h后取出细胞爬片,PBS冲洗→10%福尔马林固定→30% H_2O_2 1份+纯甲醇50份混合液,室温封闭→PBS冲洗→滴加适当稀释的一抗(阴性对照用PBS代替一抗),4 ℃过夜→PBS冲洗→滴加HRP标记的二抗,37 ℃ 20 min→PBS冲洗→DAB显色→苏木精轻度复染、脱水、透明、封片、显微镜观察,光镜拍照。

1.9 Western blot检测p38MAPK、Bcl-2、BAX蛋白的表达

药物干预处理24 h后,收集细胞,提取胞浆蛋白,用BCA法进行蛋白定量。样品蛋白经SDS-PAGE电泳、转膜,加入兔抗Bcl-2、BAX、p38MAPK多克隆抗体,4 ℃过夜。洗膜处理,用

HRP标记的二抗孵育,洗膜后显色。Bio-Rad系统进行光密度值测定,以目的条带与内参照β-actin的平均光密度值的比值表示蛋白水平,进行半定量分析。

1.10 统计学处理

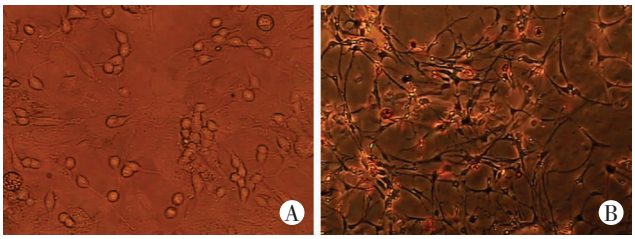
采用SPSS 16.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,方差齐时用LSD或SNK法,如不齐用Dunnett's T3法。

2 结果

2.1 神经元培养及鉴定

在倒置显微镜下观察,细胞培养第2~3天,细胞呈锥形或梭形,带有突起的细胞数明显增多;培养第6~8天,细胞胞体饱满,光晕明显,突起进一步增多,延长增粗,且分支多,形成神经元网络,状态最佳,形成完整神经网络,为实验的最好时间。见图1。

免疫荧光染色NSE抗体是显示神经元的特异标记物,存在神经元的胞质和突起中,荧光显微镜观察为绿色。免疫荧光染色结果显示,原代培养的细胞中,绿染细胞密度较大,形态良好,核大而清晰。见图2。



A:培养3 d(×200);B:培养7 d(×100)

图1 原代培养皮层神经元的形态学观察 (倒置显微镜)

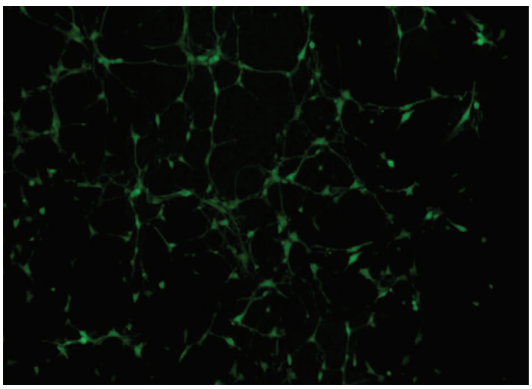


图2 免疫荧光NSE阳性神经元鉴定 (荧光显微镜×100)

2.2 MK801、SB203580对NMDA诱导的皮层神经元生存力及损伤的影响

MTT结果显示,NMDA能够引起皮层神经元生存力明显下降到36%,与对照组比较有统计学差异($P<0.01$)。而用MK801和SB203580预处理后,生存力分别明显提高到62%和55%,且联合应用效果更为明显,生存力提高到73%,与NMDA损伤组比较有统计学差异($P<0.01$);除MK801干预组与SB203580干预组比较差异无统计学意义外,联合干预组与MK801干预组和SB203580干预组比较均有统计学差异($P<0.05$,$P<0.01$)。见表1。

LDH漏出率结果显示,与对照组比较,NMDA损伤组LDH释放率明显增加($P<0.01$);与NMDA损伤组比较,各干预组LDH释放率明显降低($P<0.01$),且联合干预作用明显优于MK801和SB203580单独作用;联合干预组与MK801干预组和SB203580干预组比较均有统计学差异($P<0.05$,$P<0.01$)。见表1。

表1 MK801、SB203580对MTT和LDH漏出率的影响(%,$\bar{x} \pm s$)

组别	MTT	LDH
对照组	0.87±0.09	9.34±0.20
NMDA损伤组	0.35±0.05[a]	40.03±0.24[a]
MK801干预组	0.56±0.07[b]	28.48±0.12[b]
SB203580干预组	0.61±0.08[b]	24.61±0.19[bc]
联合干预组	0.72±0.06[bde]	20.23±0.20[bcf]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与NMDA损伤组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与MK801干预组比较;e:$P<0.05$,f:$P<0.01$,与SB203580干预组比较

2.3 MK801、SB203580对NMDA诱导的皮层神经元凋亡的影响

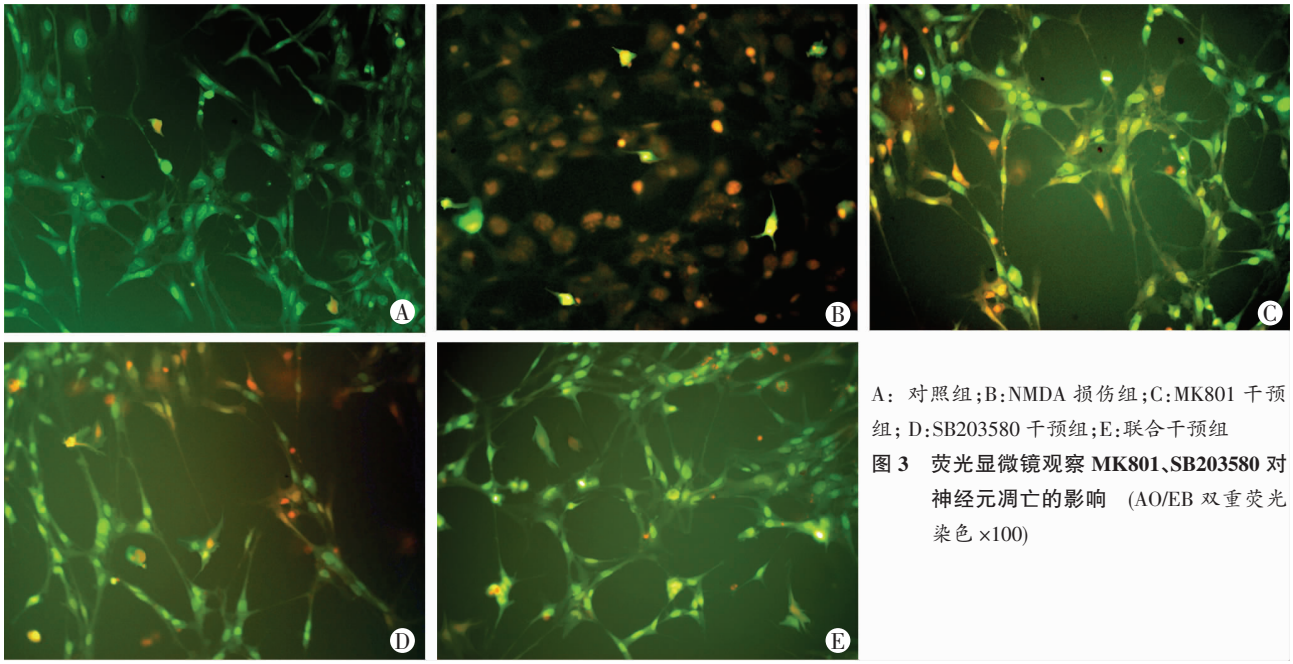
AO/EB双重荧光染色结果显示,对照组细胞密度大,只有少数凋亡细胞;NMDA损伤组凋亡细胞明显增多,呈现核固缩、边聚,变形、碎裂等变化;MK801干预组与NMDA损伤组比较,凋亡细胞明显减少;SB203580干预组与NMDA损伤组比较,凋亡细胞明显减少,细胞凋亡数较少;联合干预组与NMDA损伤组比较,正常细胞增多,凋亡细胞明显减少。与对照组比较,NMDA损伤组的凋亡细胞比例升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与NMDA损伤组比较,各干预组的凋亡细胞比例降低,特别是在联合干预组最为明显($P<0.01$);联合干预组与MK801干预组和SB203580干预组比较均有统计学意义($P<0.01$)。见图3。

对照组、NMDA损伤组、MK801干预组、SB203580干预组、联合干预组的AO/EB凋亡染色阳性细胞率分别为(7.79±1.28)%、(45.28±1.18)%、(29.62±0.77)%、(26.36±1.48)%、(15.94±1.27)%。与对照组比较,NMDA损伤组的凋亡细胞明显增加($P<0.01$);与NMDA损伤组比较,各个干预组的凋亡细胞数明显降低($P<0.01$);SB203580干预组与MK801干预组比较,差异显著($P<0.05$);联合干预组与两个独立干预组比较,差异显著($P<0.01$)。

2.4 免疫组织化学染色法检测MK801、SB203580对NMDA诱导的皮层神经元p-p38MAPK、Bcl-2和BAX蛋白表达的影响

免疫组化染色结果显示,皮层神经元细胞呈p-p38MAPK、Bcl-2及BAX阳性反应,细胞形态清楚,阳性反应产物为棕黄色颗粒,主要位于细胞质,也可见胞核表达。

p-p38MAPK及BAX表达结果:对照组可见少量p-p38MAPK及BAX表达,颜色较淡;与对照组比较,NMDA损伤组颜色着色最深,表达最为明显;而MK801、SB203580干预组及联合干预组,阳性细胞数量逐渐减少,颜色着色逐渐变浅,表达相对减



A：对照组；B：NMDA 损伤组；C：MK801 干预组；D：SB203580 干预组；E：联合干预组

图 3　荧光显微镜观察 MK801、SB203580 对神经元凋亡的影响　(AO/EB 双重荧光染色 ×100)

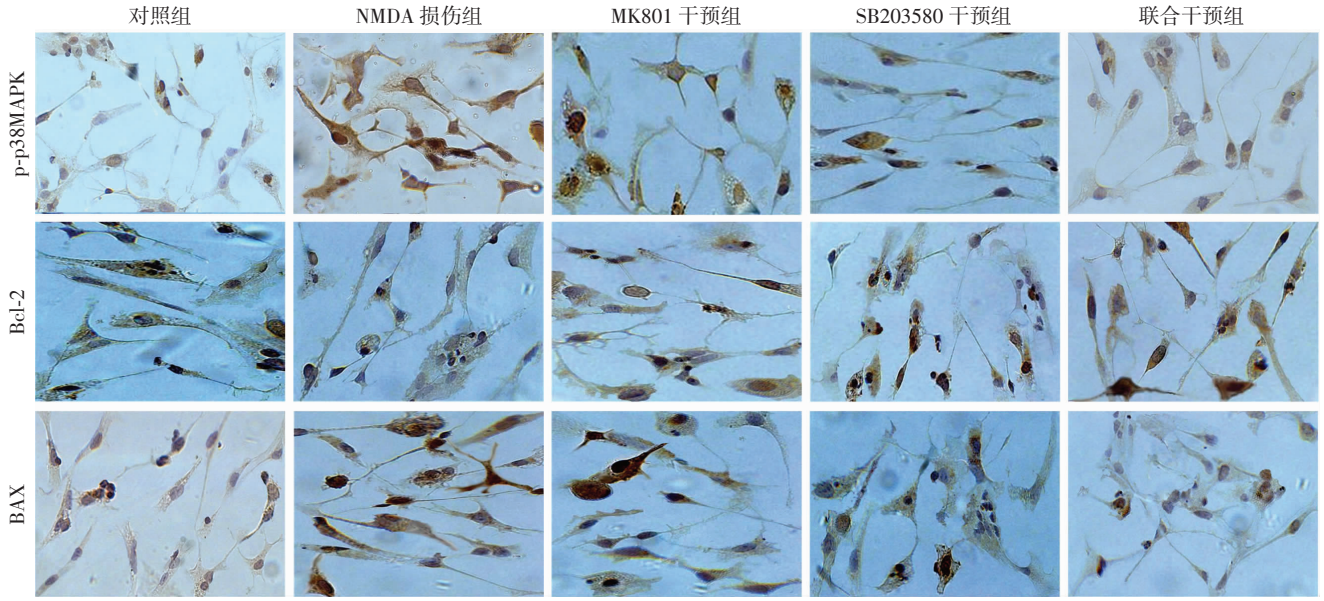


图 4　MK801、SB203580 作用下 NMDA 诱导培养皮质神经元中 p-p38MAPK、Bcl-2 和 BAX 的表达　(×400)

弱，尤其在联合干预组最为明显。灰度值分析结果显示，与对照组比较，NMDA 损伤组 p-p38MAPK 及 BAX 蛋白表达水平显著增加($P<0.01$)；与 NMDA 损伤组比较，MK801、SB203580 干预组及联合干预组 p-p38MAPK 及 BAX 表达水平下降，差异显著，以联合干预组最为明显($P<0.01$)。见图 4，表 2。

Bcl-2 表达结果：对照组表达正常，颜色着色较深，表达较为明显；而 NMDA 损伤组表达细胞数量明显减少，且颜色着色极浅，表达为弱强度；相对于 NMDA 损伤组，MK801、SB203580 及联合干预组细胞表达数量逐渐增多，且颜色逐渐加深。灰度值分析结果显示，与对照组比较，NMDA 损伤组 Bcl-2 表达水平下降($P<0.05$)；与 NMDA 组比较，MK801、SB203580 干预组及联合干预组 Bcl-2 表达水平逐渐增加，差异显著，以联合干预组最为明显($P<0.01$)。见图 4，表 2。

表 2　免疫荧光检测 MK801、SB203580 对 p-p38MAPK、Bcl-2 和 BAX 蛋白表达的影响　(光密度值，$\bar{x}\pm s$)

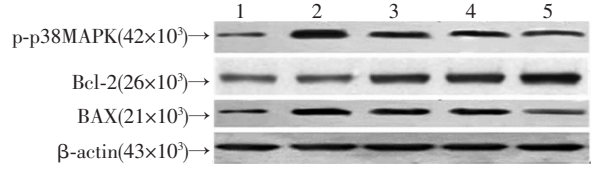
组别	p-p38MAPK	Bcl-2	BAX
对照组	2.75 ± 0.18	2.48 ± 0.11	2.19 ± 0.36
NMDA 损伤组	9.03 ± 0.13^{b}	2.07 ± 0.13^{a}	8.69 ± 0.66^{b}
MK801 干预组	6.85 ± 0.11^{c}	5.76 ± 0.23^{c}	5.38 ± 0.38^{c}
SB203580 干预组	5.70 ± 0.22^{cd}	6.25 ± 0.22^{cd}	4.55 ± 0.44^{cd}
联合干预组	3.67 ± 0.12^{cef}	9.53 ± 0.32^{cef}	3.17 ± 0.37^{cef}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与 NMDA 损伤组比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与 MK801 干预组比较；f：$P<0.01$，与 SB203580 干预组比较

2.5 Western blot 检测 MK801、SB203580 对 NMDA 诱导的皮层神经元 p-p38MAPK、Bcl-2 和 BAX 蛋白表达的影响

与对照组比较，NMDA 损伤组中 p-p38MAPK 蛋白表达增加（$P<0.01$）；与 NMDA 损伤组比较，各干预组 p-p38MAPK 蛋白表达呈下降趋势，特别是在联合干预组下降程度最为明显（$P<0.01$）；且各干预组组间比较均具有统计学差异（$P<0.01$）。见图5，表3。

与对照组比较，NMDA 损伤组 Bcl-2 表达降低（$P<0.05$），BAX 表达显著增多，Bcl-2/BAX 比值显著下降（$P<0.01$）；与 NMDA 损伤组比较，各干预组 Bcl-2 表达含量增多，BAX 表达含量减少，Bcl-2/BAX 比值增加，尤其在联合干预组差异最为明显（$P<0.01$）；联合干预组与 MK801 干预组和 SB203580 干预组比较差异均有统计学意义（$P<0.01$）。见图5，表3。



1：对照组；2：NMDA 损伤组；3：MK801 干预组；4：SB203580 干预组；5：联合干预组

图5 Western blot 检测 MK801、SB203580 对 p-p38MAPK、Bcl-2 和 BAX 蛋白表达的影响

表3 Western blot 检测 MK801、SB203580 对 p-p38MAPK、Bcl-2 和 BAX 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	p-p38MAPK	Bcl-2	BAX	Bcl-2/BAX
对照组	0.89±0.14	1.35±0.10	0.32±0.18	4.21±0.31
NMDA 损伤组	4.21±0.12^{b}	1.09±1.02^{a}	4.27±0.14^{b}	0.25±0.02^{b}
MK801 干预组	2.80±0.11^{ce}	2.30±1.74^{c}	2.64±0.07^{e}	0.87±0.06^{e}
SB203580 干预组	2.41±0.16^{ce}	2.52±0.13^{c}	2.31±0.14^{cd}	1.08±0.05^{cd}
联合干预组	1.87±0.09^{cef}	4.05±0.20^{cef}	1.45±0.21^{cef}	2.79±0.14^{cef}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与 NMDA 损伤组比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与 MK801 干预组比较；f：$P<0.01$，与 SB203580 干预组比较

3 讨论

NMDA 是一种兴奋性神经递质，参与各种病理过程[6]。NMDA 受体的过度激活可导致细胞内钙离子超载，从而剧烈地改变正常细胞的生理环境，神经兴奋毒性增加，从而导致多种神经紊乱性疾病，如帕金森疾病、阿尔茨海默病等退行性疾病和卒中、癫痫、外伤性精神损伤等[7-9]。越来越多的证据表明 NMDA 的过度刺激在程序化细胞死亡中起着关键的作用[3,5,10]。

MK801 是 NMDA 受体特异性的拮抗剂，通过阻断 Ca^{2+} 内流，进而降低兴奋性毒性引起的迟发性神经细胞损伤[11]，因此 MK801 介导的脑损伤保护性作用是以抑制 Ca^{2+} 内流为特征。Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使，影响多条信号通路从而介导对细胞的调控[5,10]，其中就包括有 p38MAPK 的存在。

p38MAPK 是 MAPK 家族中的一种介导细胞凋亡信号转导的主要成员，在机体许多生理、病理过程中如细胞生长、细胞损伤和凋亡、炎症及应激反应的调控中起着至关重要的作用[3,11]。近来研究提示抑制 p38MAPK 信号通路，可以明显减轻脑损伤后对神经细胞的继发性损害，在中枢神经系统有证据表明 p38MAPK 与神经元的死亡或凋亡密切相关[1,12]。SB203580 是 p38MAPK 的一种特异性抑制剂，通过抑制其活性，最终实现对 p38MAPK 通路的抑制。

既往研究表明，NMDA 在 50 μmol/L 的浓度下可以明显造成细胞的损伤，包括凋亡和坏死，而这些主要依赖于 NMDA 作用的持续时间[13]。神经元内有大量的 LDH，正常神经元内 LDH 漏出很少，神经元损伤后因为细胞膜通透性增加，导致 LDH 漏出也增加，因此检测神经元培养液中的 LDH 含量是评定神经元损伤程度的一项指标。

在本实验中，通过制造 NMDA 诱导细胞外皮层神经元损伤模型，首先通过 MTT 和 LDH 释放率测定两种方法，验证了 MK801 和 SB203580 不同程度的保护性作用的存在，对于它们的应用可以使损伤神经元的生存力明显提高，LDH 释放率明显下降，且它们的联合使用不但不产生拮抗作用，反而使保护作用大大提高。以上结果说明 NMDA 受体、p38MAPK 的活化是介导神经元毒性损伤的主要通路。所以我们推断，在应激性刺激后，它们发挥作用的机制，某种程度上可能存在交汇或者是个递进的过程，但是具体的过程和机制我们仍不清楚。在此基础上我们通过免疫组织化学及 Western blot 实验研究 MK801 对 p38MAPK 表达的影响，发现 NMDA 损伤组，磷酸化 p38MAPK 的表达明显升高，然而在 MK801 干预后，可显著抑制 p38MAPK 激活，其蛋白表达明显下降，表明该信号转导通路参与了 MK801 的保护效应，进一步说，在外来刺激毒性损伤中，NMDA 受体的激活是 p38MAPK 激活的前提。虽然在我们的研究中没有检测钙离子与 p38MAPK 的关系，但是以往研究证明 p38MAPK 可以调节细胞内钙离子的内流[14]。而钙离子内流主要由 NMDA 受体介导，所以我们更加确信，MK801 与 SB203580 在神经元毒性损伤中的保护作用具有共同

的机制。

细胞的凋亡与抗凋亡之间存在一种精细的平衡，当细胞受到外来刺激时，这种平衡一旦被打破，则可启动细胞的凋亡程序[5,12]。Bcl-2属于抗凋亡蛋白家族，是与神经元生存和凋亡性死亡相关的调节蛋白[13]。BAX是一种凋亡前体蛋白，是p53的靶基因，BAX可刺激细胞色素C的外流和其他凋亡诱导因子的外流，诱导细胞凋亡，与此相反，Bcl-2抑制细胞色素C的释放和Caspase成员的激活，阻止细胞凋亡[4,12,14]，而Bcl-2与BAX的比值是决定受到外来化学刺激的细胞生死的关键[9]。

p38MAPK信号系统对于神经元凋亡的调控是否存在这样的切点，值得深入研究。文献报道，Bcl-2/BAX是p38MAPK发挥作用过程中重要的组成部分[5,15]。在MK80l影响p38MAPK的同时，是否会像p38MAPK那样进一步影响Bcl-2/BAX，而决定细胞损害后的命运，对此本实验给予了回答。我们的研究发现MK801、SB203580均使p-p38MAPK、BAX表达下降，而使Bcl-2表达增加，Bcl-2/BAX比值增加，进而减少凋亡的发生。对于NMDA诱导的细胞凋亡数目和形态学的变化我们已在AO/EB染色中观察到，MK801、SB203580均能不同程度降低NMDA诱导的细胞凋亡。所以结合MTT和LDH释放率的检测结果我们更有理由相信，MK801与SB203580对神经元的损伤性保护具有共同的机制，是通过抑制凋亡相关蛋白的表达而发挥保护效应。

总之，MK801、SB203580对NMDA诱导的皮质神经元损伤具有保护作用，p38MAPK通路可能参与介导MK801的保护作用，其共同机制部分是通过抑制p38MAPK信号通路介导的凋亡相关蛋白实现的。因此更加深入的研究可能会对凋亡和神经退行性疾病的生物学治疗和预防提供方向，具有重要的理论和现实意义。

参考文献：

[1] Molz S, Decker H, Dal-Cim T, *et al*. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling [J]. Neurochem Res, 2008, 33(1): 27-36.

[2] Xu B, Xu Z, Deng Y, *et al*. MK-801 protects against intracellular Ca^{2+} overloading and improves N-methyl-D-aspartate receptor expression in cerebral cortex of methylmercury-poisoned rats[J]. J Mol Neurosci, 2013, 49(1): 162-171.

[3] Chen J, Errico S L, Freed W J. Reactive oxygen species and p38 phosphorylation regulate the protective effect of Delta9-tetrahydrocannabinol in the apoptotic response to NMDA[J]. Neurosci Lett, 2005, 389(2): 99-103.

[4] 罗云，朱文静，徐运. MK801对氧糖剥夺神经元P38MAPK和BCL2/BAX蛋白表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2008, 17(5): 433-436.

[5] Yang X R, Sun P, Qin H P, *et al*. Involvement of MAPK pathways in NMDA-induced apoptosis of rat cortical neurons[J]. Sheng Li Xue Bao, 2012, 64(6): 609-616.

[6] Miloso M, Scuteri A, Foudah D, *et al*. MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(6): 538-548.

[7] 刘学文，胥向红，郎森阳，等. p38MAPK蛋白在体外培养神经元中的表达及W-7的干预作用[J]. 吉林大学学报：医学版，2011, 37(1): 47-50.

[8] Zhang R, Sun L, Hayashi Y, *et al*. Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin-1beta[J]. Neurobiol Dis, 2010, 38(1): 68-77.

[9] Chaparro-Huerta V, Flores-Soto M E, Gudino-Cabrera G, *et al*. Role of p38 MAPK and pro-inflammatory cytokines expression in glutamate-induced neuronal death of neonatal rats[J]. Int J Dev Neurosci ,2008, 26(5), 487-495.

[10] Lu T H, Hsieh S Y, Yen C C, *et al*. Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury [J]. Toxicol Lett, 2011, 204(1): 71-80.

[11] Yan Y, Bian J C, Zhong L X, *et al*. Oxidative stress and apoptotic changes of rat cerebral cortical neurons exposed to cadmium *in vitro* [J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(2): 172-181.

[12] Rivera-Cervantes M C, Torres J S, Feria-Velasco A, *et al*. NMDA and AMPA receptor expression and cortical neuronal death are associated with p38 in glutamate-induced excitotoxicity *in vivo*[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(5): 678-687.

[13] Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, *et al*. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. Neuroimmunomodulation, 2006, 13(2): 63-68.

[14] Liang H L, Dhar S S, Wong-Riley M T. p38 mitogen-activated protein kinase and calcium channels mediate signaling in depolarization-induced activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in neurons[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(3): 640-649.

[15] Segura-Torres J E, Chaparro-Huerta V, Rivera-Cervantres M C, *et al*. Neuronal cell death due to glutamate excitotocity is mediated by P38 activation in the rat cerebral cortex[J]. Neurosci Lett, 2006, 403(3): 233-238.

（**收稿**：2013-06-24；**修回**：2013-09-11）

（编辑　王小寒）